

## Posudek oponenta na diplomovou práci

**Jméno oponenta:** Stanislav Vosolsobě

**Datum:** 17.1.2024

**Autor:** Bc. Petr Šesták

**Název práce:**

Role  $\beta$ -podjednotky komplexu asociovaného s nascentním polypeptidem (NAC) při odpovědi huseníčku rolního na různé abiotické stresy

**Cíle práce**

Cíle práce jsou velmi jasně formulované, cílem bylo zjistit, zda přítomnost podjednotky NAC $\beta$  ovlivňuje překonávání osmotického stresu semenáčků, zjistit, jak se mění při stresu exprese NAC genů a prokázat jejich chaperonovou aktivitu. Práce má stanovenou hypotézu (zejména v cíli 1), která je testována, nejsou tedy pouze prováděny experimenty bez apriorních předpokladů.

**Struktura (členění) práce**

Rozsah práce je 83 stran (70 stran vlastní práce, z toho 13 stran literárního přehledu) Nechybí anglický i český abstrakt včetně klíčových slov a všechny další náležitosti diplomové práce.

**Formální úroveň práce** (obrazová dokumentace, grafika, text, seznam literatury)

Formální úroveň je obecně velmi dobrá, dovolím si jen marginální kritiku bezpatkového fontu v obsahu, v číslování stránek a v tabulkách, výskyt mnohočetné citace ve dvou závorkách za sebou místo sdružené do jedné, graf 3 rozdělený na dvě stránky s popisem pouze na jedné a odsazování odstavců po nadpise, které se v profesionální typografii nepraktikuje. Obecně však chválím správné psaní jednotek zejména mezer před symbolem % a °C.

**Logická stavba a jazyková úroveň práce**

Práce je psána nadstandardně srozumitelně, text je velmi dobře logicky členěn a ukazuje, že autor má nadání pro psaní odborných textů. Chválím snahu o čistotu českého jazyka, kdy se autor vyhýbá anglicismům a hledá české ekvivalenty. Nicméně třeba k obratu „nadexprese“ mám poněkud výhradu, neboť je slučováno cizí slovo s českou předponou. Z podobného důvodu bych doporučoval vyvarovat se tvarům „vysterilizovaný“, „vyextrahovaný“, „napipetovaný“, kdy se jedná opět nevhodné míšení cizího kořene s českou předponou, která v tomto případě nepřidává nový význam. Taktéž upozorňuji na obrat „proteiny vázící se na“, kdy správně je tvar „proteiny vázající se na“.

**Literární přehled:**

Literární úvod je podrobný a začíná obecným popisem mechanismů translace, čímž je práce dobře uvedena i pro nezasvěcené čtenáře. Je psán srozumitelně a čtivě. Týká se výhradně NAC proteinů, mohla však být i připojena kapitola o holdázových a foldázových testech, které jsou představeny až v sekci výsledkové.

**Materiál a metody:**

Z cílů práce (sledování odpovědi rostlin modifikovaných v NAC $\beta$  na stres a měření exprese) by se mohlo zdát, že práce bude využívat poměrně triviální metody, nicméně třetí cíl, stanovení holdázové aktivity, zahrnuje GodenBraid klonování, transformaci bakterií a rostlin, purifikaci proteinů a další velmi pracné metody, čímž se stává šíře metod použitých v práci velmi úctyhodnou. Jejich dokumentace je velice pečlivá, jsou popsány plně reprodukcibilně. K popisu metodiky mám jen drobné připomínky, například chybí zmínka o excitaci u fluorescenční binolupy, chybí údaje o výrobci a katalogovém čísle u enzymů a pufrů pro PCR (kde je to důležitější, než třeba u NaCl), v sekci o PCR z genomické DNA chybí odkaz

na primery.

V popisu výsevů je uvedeno, že bylo provedeno např. 5 opakování výsevů, chybí však být explicitní údaj, kolik bylo nasazováno jednotlivých nasazených misek.

Ve výsevovém pokusu byl volen komplexní faktoriální design, kdy byl na několika genotypech sledován vliv různých koncentrací ošetření v časové řadě. Ačkoliv se jedná o často používaný design v experimentální biologii rostlin, jeho aplikace je poněkud zrádná – ačkoliv přináší výsledky vysoké vypovídající hodnoty, jejich korektní statistické hodnocení je netriviálním úkolem. Zde zvolený přístup založený na dílčích jednovýběrových testech ANOVA vede ke zbytečně pesimistickým výsledkům, neboť nemůže zohlednit generální trendy, které jsou v systému. Navíc při aplikaci analýzy variance na početní data (klíčivost) se bere v úvahu jako N pouze počet opakování výsevů (tedy např. 5), nikoliv počty sledovaných rostlin (stovky) a pokud nebyla provedena transformace dat, je zde i vysoké riziko, že byly porušeny požadavky na homogenitu rozptylů, neboť v případě proporčních dat variabilita například při 90% a 50% klíčivosti se musí v principu lišit. Vhodnějším přístupem by dle mého názoru byla logistická regrese (čili zobecněný lineární model s binomickým rozdělením) a konstrukce víceparametrového modelu (čas, koncentrace genotyp), kdy replikace by byla zahrnuta jako náhodný efekt.

#### **Experimentální část:**

Výsledková část je popsána taktéž velmi srozumitelně a čtivě, vždy je nastíněn design experimentu a poté představeny výsledky. Jejich prezentace je velmi solidní, akorát v grafu 1 chybí zmínka o významu zde uvedených chybových úseček a v grafu 2 chybí informace o variabilitě mezi replikacemi úplně.

Osobně bych doporučoval místo sloupcových grafů používat box-ploty či violin-ploty se znázorněním jednotlivých datových bodů (to zejména u expresních dat, kde je N velmi malé). U grafů trendů na časové ose by bylo ideální prezentovat jednotlivé body a trend fitovaný statistickou analýzou včetně konfidenčních intervalů.

V holdázovém textu je pro každé opakování ukázána pouze jedna sada bodů, mohlo by být explicitně zmíněno, že bylo provedeno pouze jedno opakování. V této situaci je nemožné zhodnotit variabilitu měření a diskutovat, jestli sledovaný trend mezi variantami není dán jen náhodou.

Celkově však musím konstatovat, že množství odvedené práce je zcela nadstandardní pro diplomovou práci.

#### **Diskuze:**

Diskuze je velmi kvalitní, hodnotí příčiny neúspěchu experimentů, navrhuje další cesty výzkumu a veškeré výsledky porovnává s literaturou.

#### **Závěry (Souhrn):**

Práce obsahuje výstižné závěrečné shrnutí odpovídající dosaženým výsledkům.

#### **Splnění cílů práce a celkové hodnocení:**

V práci byly vrchovatě splněny cíle v míře hodné diplomové práce. Autor si úspěšně osvojil celou paletu molekulárně-biologických metod, velmi pečlivě je popsal v práci a diskutoval úspěšnost jejich provedení. Primární záměr experimentů sice nebyl kompletně splněn, v diskuzi je však neúspěch pečlivě rozebrán a zejména u testu holdázové aktivity je šance na budoucí optimalizaci metody.

Rád bych vyzdvihl odvahu, kdy autor realizoval komplexní molekulárně-biologický protokol od klonování po purifikaci proteinů s vědomím, že jeho finální úspěšnost závisí na jediném biochemickém testu, který nebyl doposud na pracovišti etablován. Na tomto místě by možná bylo vhodné již do prvotního designu zainkorporovat paralelní experimenty, kdy by například připravené konstrukty mohly sloužit k hledání interaktorů pomocí co-immunoprecipitace a MS/MS analýzy.

**Otázky a připomínky oponenta (povinná část posudku):**

- 1) Jaké je stáří divergence obou rostlinných homologů NAC $\beta$ ?
- 2) Pokud je u Archaea tvořen komplex pouze homodimerem z alfa-podjednotek, existuje evoluční příbuznost mezi alfa a beta podjednotkou?
- 3) Hraje NAC roli i u proteinů, které nemají signální peptid, například některé transmembránové peptidy? Jak funguje v tomto případě navedení proteinů do ER?
- 4) Jaký mechanismus působení osmotického stresu na destabilizaci proteinů předpokládáte na molekulární úrovni?
- 5) Proč nebyly ve výsevovém experimentu použity čtvercové misky?
- 6) Chápu dobře, že overexpresní konstrukty byly vytvořeny na pozadí WT, nikoliv příslušné T-DNA mutace?
- 7) Absence pozitivního efektu overexprese NAC proteinů je vysvětlována možností umlčení, potvrzují ji však data z qPCR?
- 8) Neuvažovali jste exprimovat protein metodou infiltrace do tabákových listů? Jaká by byly případné výhody/nevýhody?
- 9) Jak si vysvětlujete masivní pokles absorbance v holdázovém testu u GroEl v posledním čase?
- 10) Jaký je názor autora/týmu na EtBr, od kterého bylo na KEBR upuštěno před cca 15 lety ve prospěch GelRed?

**Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)**

výborně (1)    velmi dobře (2)    dobře (3)    nevyhověl/a (4)

Podpis oponenta: